

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-231417

(43)公開日 平成8年(1996)9月10日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 片内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------------------|-------|--------|------------------------|---------------------------|
| A 6 1 K 38/22 9/127 | A C C | | A 6 1 K 37/24 9/127 | A C C L F D D |
| 47/24 47/28 | | | 47/24 47/28 | |
| 審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|-------------|----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平7-226610 | (71)出願人 | 000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号 |
| (22)出願日 | 平成7年(1995)9月4日 | (72)発明者 | 永井 恒司 東京都文京区本駒込1-23-10-103 |
| (31)優先権主張番号 | 特願平6-327067 | (72)発明者 | 米谷 芳枝 神奈川県川崎市中原区木月1315 木月住宅 1-103 |
| (32)優先日 | 平6(1994)12月28日 | (74)代理人 | 弁理士 湯浅 恭三 (外5名) |
| (33)優先権主張国 | 日本 (J P) | | |

(54)【発明の名称】 エリスロポエチンのリポソーム製剤

(57)【要約】

【効果】 溶液中で振盪および超音波処理等の機械的応力に対して不安定であるE p oを、高い封入効率で、しかも活性の低下から保護するリポソームおよびその製法を提供する。

【構成】 ステロール類を配合したリン脂質を用いて逆相蒸発法によってE p oを封入することによりE p oのリポソームを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エリスロポエチンを含むリボソーム。

【請求項2】 リボソームの小胞壁を形成する脂質が天然レシチン、合成レシチン、ケファリンおよびスフィンゴミエリンから成る群から選択される1または2以上のリン脂質である請求項1記載のリボソーム。

【請求項3】 上記の小胞壁を形成する脂質がステロールおよび／またはステロールグリコシドを更に含有することを特徴とする請求項2記載のリボソーム。

【請求項4】 上記ステロールまたはステロールグリコシドが、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラジカステロールおよびコレステロールから成る群から選択される1または2以上のステロールまたはそれらステロールのモノグリコシドであることを特徴とする請求項3記載のリボソーム。

【請求項5】 上記リン脂質がジパルミトイルホスファチジルコリンである請求項2、3または4記載のリボソーム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、エリスロポエチンを含むリボソームに関する。

【0002】

【従来の技術】エリスロポエチン（以下、Epoと略称する）は、主として腎臓で、およびこれより少量が肝臓で産生される糖タンパクである。Epoは約30KDの分子量を有する単鎖ポリペプチドであり、その分子量の約40%は炭水化物である。Epoの生理学的作用は、赤血球前駆細胞の増殖および分化を調整することである。最近では、遺伝子工学により大量生産され上市されており、貧血の治療に用いられている。

【0003】今日では、Epoのヒトへの投与は、静脈および皮下注射に限定されている。リボソームの放出系を使用することにより、Epoについての治療可能性、例えば非経口のおよび経口的投与、を拡げることができる。しかしながら、Epoが溶液中で機械的応力、特に振盪および超音波処理に対して弱く、通常のリボソーム調製の条件に適合しないと考えられたため、これまで研究が行われてこなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題及びその解決手段】本発明は、Epoを高い封入効率で封入し、しかもEpoの活性を保護するリボソームおよびその製法を提供することを目的とするものである。

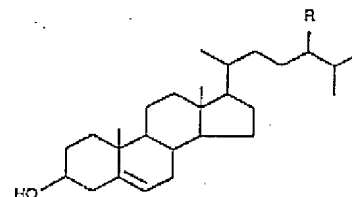
【0005】本発明者らは、リボソームの製造に際して、リボソーム小胞壁の形成に用いるリン脂質にステロール類（以下SAと略称する）および／またはそのグリコシド（以下SAGと略称する）を配合し、このリン脂質を用いる逆相蒸発法によってEpoを封入することにより、所期の目的を達成することに成功した。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明によって提供されるEpoを含有するリボソームは、天然レシチン、合成レシチン、ケファリンおよびスフィンゴミエリン等のリン脂質を用いることによって製造できる。本発明では、特にジパルミトイルホスファチジルコリン（以下DPPCと略称する）が好ましい。また、リン脂質にSAまたはSAGを配合することによって、よりEpoの活性が保持される。本発明で使用できるSAとしては、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラジカステロールまたはコレステロール（Ch）を単独でまたは2つ以上の混合物で用いることが好ましい。また、SAGは上記ステロール類（SA）のグリコシド、特にモノグリコシドであることが好ましい。上記のSAは次式で表される。

【0007】

【化1】



式中R=CH₃（カンペステロール）；R=C₂H₅（シトステロール）；R=C₂H₅ および Δ^{22} （スチグマステロール）；R=CH₃ および Δ^{22} （ブラジカステロール）；R=H（コレステロール）である。本発明におけるリン脂質とSAまたはSAGとの好ましいモル配合比率は、7：1から7：4の範囲である。

【0008】本発明のEpo含有リボソームは、上記のリン脂質とSAおよび／またはSAGとの混合物を使用し、逆相蒸発（以下REVと略称する）法によってEpoをリボソーム内に封入した。リボソームをラットのへ皮下投与または経口投与し、血中の循環性網状赤血球数を測定することによって、リボソーム内のEpoの活性を評価し、また高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるリボソーム中のEpo濃度の測定値と比較した。

【0009】以下に、本発明を実験例および実施例により、さらに詳細に説明する。

【0010】

【実施例】

（材料：以下の実施例において次の材料を使用した。）リン脂質としてはDPPCはシグマ・ケミカル社製（米国）、大豆ステロール（SS）および大豆ステロールのグリコシド（SG）は龍角散製、コレステロール（Ch）はシグマ・ケミカル社製、Epoは中外製薬製、カルセインは東京化成工業製を使用した。その他の化学物質はすべて試薬級のものをを用いた。尚、ここで使用したSSおよびSGは、それぞれ、 β -シトステロール（約

49.9%)、カンベステロール(約29.1%)、ステリグマステロール(約13.8%)およびブラジカステロール(約7.2%)の混合物、およびそのモノグリコシド類の混合物であった。Chは実質上単一の成分からなる市販品であった。

【0011】実施例1

(1) SSおよびSG-リボソーム封入Epoの製造
リボソームは逆相蒸発法に従って製造した。DPPC(105 μ mol)およびSSおよびSG(30 μ mol)(DPPC:SSまたはSG=7:2、モル比)のクロロホルム溶液を50mlのナス形フラスコ中に入れ、そしてこの有機溶媒を室温でロータリーエバポレーターによって減圧除去した。脂質の薄膜をクロロホルム3mlおよびイソプロピルエーテル3ml中に再溶解させた。得られる有機相に、1mlのEpo溶液(180,000IU/ml)および1mlのリン酸生理食塩水緩衝液(137mM NaCl/2.6mM KCl/6.4mM Na₂HPO₄・12H₂O/1.4mM KH₂PO₄; pH7.31; 以下PBSと略す)を含む水相を添加した。この混合物を、水浴型超音波処理機(ホンダ・エレクトロニクス社製、W220R、200W、40KHz)中で50℃で、この混合物が均質なW/Oエマルジョンになるまで4分または1分間超音波処理した。次にこのエマルジョン中の有機溶媒をロータリーエバポレーター、アスピレーターを用いて減圧(400mmHg)下で除去し、50-55℃で30分間穏やかな*

| 製剤 番号 | 添加物 (SS又はSG) | 超音波処理時間 (分) | ゲル透過の 有無 |
|----------|-----------------|----------------|-------------|
| 1-a | SS | 4 | 有り |
| 1-b | SS | 4 | 無し |
| 2-a | SG | 4 | 有り |
| 2-b | SG | 4 | 無し |
| 3-a | SS | 1 | 有り |
| 3-b | SS | 1 | 無し |
| 4-a | SG | 1 | 有り |
| 4-b | SG | 1 | 無し |

(2) 封入されたリボソームの体積の測定

封入体積は、与えられた量の脂質によって囲まれた体積として、そして総脂質1molあたりの閉じこめられた体積(リットル数)という単位(L/mol)で、定義される。封入された体積を測定するためのマーカーとしてカルセインを使用した。リボソーム(DPPC 105 μ molおよびSSまたはSG30 μ mol)の製法においては、乾燥させた脂質薄膜が、20mMのカルセインを含有する、クロロホルム3ml、イソプロピルエーテル3mlおよびPBS2ml中に溶解させた。Epo含有リボソームを製造するために同じREV法および押し出し法を適用した。ゲル透過を通過した後のカルセインを封入している製剤をPBSで1000倍に希釈して、蛍光強度(Fb)を蛍光スペクトロメーター(490nmで励*

*窒素流(500ml/分)でフラッシュした。残った水相をPBSで2倍希釈し、約60℃で0.4および0.2 μ mの孔径のポリカーボネート膜[ヌクレポア(Nucleopore)社、米国]を通して連続的に押し出し調整した。リボソームのサイズ分布は、ナイコンP370・サブミクロン・パーティクル・アナライザー(Nicom P370 Submicron Particle Analyzer)[パシフィックサイエンティフィック(Pacific Scientific)、米国カリフォルニア州]によって測定した。SSおよびSG-リボソームについて推定されたサイズは、サイズ分布において完全に均質であり、平均直径は各々134-166nmであった。押し出し調整後に0.5mlの製剤をPBSを用いてセファデックス(Sephadex)G-50カラム(1.8×35cm、ファルマシア(Pharmacia)、スウェーデン)を通過させて、未封入のEpoを除去した。各分画は4.5mlを含有していた。ゲル透過後のリボソーム懸濁液の希釈倍率は9であった。SS-リボソームおよびSG-リボソーム中に封入されているEpoは、各々Epo/SS-リボソームおよびEpo/SG-リボソームとして表わされる。

【0012】製剤は以下の実験に供するため次のように表示した。

【0013】

*起、520nmで発光;日立F-4010)で測定した。そして次に1mlの試料に10%トリトン(Triton X-100)溶液30 μ lを加えることによってリボソームを完全に崩壊させた後、蛍光強度(Fa)を測定した。リボソーム中に封入しているカルセインの蛍光強度(Flipo)は、式(Flipo=Fa-Fb)に従って計算した。リボソーム中に封入しているカルセインの量(Clipo)は、Flipoおよび、既知濃度のカルセインによって用意された検量線から計算された。SSまたはSG-リボソームの封入体積は、Clipoおよび、リン脂質B-テスト:ワコー(和光純薬工業株式会社)を用いることによって決定したリボソーム中のDPPCの濃度から計算したとき、各々7.08または4.74L/mol脂質であった。

【0014】実施例2

下記の条件以外は上記実施例1(1)記載の方法に従ってSS、SGおよびCh-リボソーム封入Epoを製造した。

【0015】DPPCとの配合比率は、実施例1と同様に7:2(モル比)であった。超音波処理は2分とした。また、リボソームを整粒するために用いるポリカーボネート膜の孔径は0.1 μ mおよび0.2 μ mであった。ポリカーボネート膜を通過させた後、実施例1の方*

| 製剤番号 | 添加物 | 超音波処理 (分) | 整粒孔径 (μ m) | リボソーム体積 (L/モル脂質) |
|------|-----|--------------|--------------------|---------------------|
| 5 | SS | 2 | 0.1 | 5.60 |
| 6 | SG | 2 | 0.1 | 1.92 |
| 7 | Ch | 2 | 0.1 | 5.33 |
| 8 | SS | 2 | 0.2 | 6.82 |
| 9 | SG | 2 | 0.2 | 4.72 |
| 10 | Ch | 2 | 0.2 | 4.93 |

実験例1 動物実験による皮下投与後の循環性網状赤血球数

すべての実験で、生後9週(約300g)の雄のウィスター(Wistar)ラット(埼玉実験動物供給所)を使用した。ラット(1グループ3匹)はジエチルエーテルで軽く麻酔をかけてから、遊離のEpo溶液または実施例1で製造したEpoを封入しているリボソームの懸濁液を首の背側に皮下投与した。投与前、投与後2日、4日および7日目に背中足の静脈から20 μ lの血液試料を採取し、この試料を直ちに10mlのセルパック(自動血球計数装置用希釈液、東亜医用電子株式会社)で希釈して希釈された血液溶液を作った。この希釈された血液溶液を計数の約15分前に約100 μ lの溶血試薬、クイックライザー(東亜医用電子株式会社)で処理した。溶血させた血液をマイクロセルカウンター(Sysmex F-500、東亜医用電子株式会社)およびセルモニター(Sysmex CM-5、東亜医用電子株式会社)を用いて計数した。セルモニターの感度は4にセットし、ディスクリミネーターは1または5にセッ*

$$y = -761 + 429 \times (10 \lg x) \quad (r = 0.999) \quad (1)$$

であった。

【0020】製剤1-aおよび製剤2-aを皮下投与したとき、循環性網状赤血球数は図2に示すようにEpo溶液のように増加した。

【0021】このためEpo/SSおよびEpo/SG-リボソーム懸濁液の投与は、上記のような3つの用量のかわりに、1つの用量、すなわちゲル滲過後または前では各々0.10または0.011ml/300gラットの体重、の用量を用いて実施した。

【0022】ゲル滲過前にはEpoはリボソーム中に未★

*法で製剤をゲル滲過し、未封入のEpoを除去した。

【0016】このようにして得られたリボソームは実施例1(2)の方法により、封入されたリボソームの体積を測定した。なお、Epoを封入するSS、SGおよびCh-リボソームを各々Epo/SS-リボソーム、Epo/SG-リボソームおよびEpo/Ch-リボソームとして表す場合がある。結果を次の表に示す。

【0017】

※トした。ディスクリミネーターのレベル1および5で計数した数の差を、循環性網状赤血球数として計算した。ゲル滲過後のEpo/SSおよびEpo/SG-リボソーム懸濁液を、0.3、0.1および0.03ml/300gラット、で投与し、一方ゲル滲過前のこれらを0.033、0.011および0.003ml/300gラットで、各々投与した。ゲル滲過の前後の間の用量の差は、ゲル滲過後のリボソーム懸濁液の希釈倍率(9)に等しかった。

【0018】試験結果

Epo溶液を皮下に投与したとき、血中の循環性網状赤血球数は、図1に示すように有意に増大し、2日目にピークに達し、その後、7日目に投与前の水準まで減少した。

【0019】Epo溶液の皮下投与の後、2日目の血中の循環性網状赤血球数はEpoの対数用量と直線関係を示す。Epo溶液の皮下投与後の、2日目の血中の循環性網状赤血球数(y 、 $\times 100/\mu$ l)対Epoの用量(x 、IU/kg)の直線回帰式は

★封入および封入の懸濁液として存在した。循環性網状赤血球数は未封入および封入Epoの投与によって増加した。製剤1-bの皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数は、図3に示されるようにt-検定($p < 0.05$)により、どんな投与体積の製剤1-aのそれよりも有意には高くなかった。

【0023】表1は、一連のリボソーム懸濁液製剤の皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数を表わす。

【0024】

【表1】

7
表1 1分および4分の超音波処理をして製造したEpo/SSおよびEpo/
SG-リボソームの皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数

| 製剤 番号 | リボソームの型 | ゲル濾過 | 超音波処理 時間(分) | 投与体積 (nl/300g) | 網状赤血球 数 ^{a)} (100/ μ l) |
|----------|---------|------|----------------|-------------------|--|
| 1-b | SS | 前 | 4 | 0.011 | 281 \pm 45 |
| 1-a | SS | 後 | 4 | 0.10 | 275 \pm 45 |
| 2-b | SG | 前 | 4 | 0.011 | 421 \pm 102 |
| 2-a | SG | 後 | 4 | 0.10 | 353 \pm 116 |
| 3-b | SS | 前 | 1 | 0.011 | 569 \pm 31 |
| 3-a | SS | 後 | 1 | 0.10 | 263 \pm 38 |
| 4-b | SG | 前 | 1 | 0.011 | 515 \pm 27 |
| 4-a | SG | 後 | 1 | 0.10 | 204 \pm 69 |

^{a)} 平均 \pm S. D.

製剤2-bおよび製剤2-aの循環性網状赤血球数もまた、t-検定($p < 0.05$)により有意の差は示さなかった。しかし製剤4-bおよび製剤4-aと同様に製剤3-bおよび製剤3-aについては、循環性網状赤血球数はt-検定($p < 0.05$)により有意の差異を示した。これらの結果は、Epo/SSおよびEpo/SG-リボソーム懸濁液中のリボソームに封入していないEpoは、4分の超音波処理によって製造したものは、顕著な作用を示さず、一方、1分の超音波処理によって製造したものでは循環性網状赤血球数において顕著な作用を示した。

【0025】実験例2 HPLCによるEpo濃度の測定

リボソームの製造後のEpo濃度をHPLCによって測定した。Epoを含有するリボソーム懸濁液0.3mlを、リボソームを崩壊させるために0.09mlのクロロホルムとともに振盪した。3000rpmで10分間遠心分離した後、Epoを含有する水相またはEpoの標準溶液の0.2mlをHPLCにインジェクトした。Epoの分析用のHPLC系は、ブチルシリルシリカゲルカラム(Vydac C₄、250 \times 4mm、5 μ *

*m)、ウォーターズ600マルチソルベント送液システム、およびウォーターズ486チューナブルUV/VIS検出器(日本ウォーターズリミテッド)より成っていた。移動相Aは水:アセトニトリル:トリフルオロ酢酸(400:100:1)より成り、Bは水:アセトニトリル:トリフルオロ酢酸(100:400:1)より成っていた。カラムは35%のBおよび65%のAより成る移動相で平衡させた。Bの百分率は、インジェクション後5分間は35%に保持し、15分かけて直線的に100%まで変化させた。Bの百分率を2分間100%に保持した。流量は1ml/分であった。Epoは波長214nmで検出され、室温で保持時間約20分で溶出した。結果は下記の表2に示す。

【0026】実験例3 Epoの活性と、HPLC法によって測定されたEpo濃度との比較

HPLC法によって評価したゲル濾過前および後のEpo/SSおよびEpo/SG-リボソームのEpo濃度を表2に要約した。

【0027】

【表2】

9
表2 HPLC法によって評価したEpo濃度と、Epo/SSおよびEpo/SG-リボソームの皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数対用量の直線回帰式により評価したEpoの活性との比較 10

| 製剤番号 | Epo濃度(IU/ml) ^{b)} | Epoの活性(IU/ml) ^{c)} |
|------|----------------------------|-----------------------------|
| 1-b | 9406 ^{d)} | 7293 |
| 1-a | 756 ^{d)} | 785 |
| 2-b | 10917 ^{e)} | 15494 |
| 2-a | 511 ^{d)} | 1193 |
| 3-b | 37435 ^{d)} | 34234 |
| 3-a | 814 ^{d)} | 734 |
| 4-b | 17446 ^{e)} | 25629 |
| 4-a | 312 ^{e)} | 537 |

^{b)} HPLC法により評価したEpo濃度

^{c)} 循環性網状赤血球数(表1)、投与体積および直線回帰式(1)を用いることにより計算した

^{d)} 2回の測定の平均値

^{e)} 1回の測定値

リボソーム懸濁液の皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数から、直線回帰式(1)および投与体積(表1)を用いることにより、Epoの活性を計算する。

【0028】Epo/SS-リボソーム(製剤1-a、3-a)は、HPLCによって評価されたEpo濃度が循環性網状赤血球数によって評価されたEpoの活性に匹敵することを示し、一方、Epo/SG-リボソーム(製剤2-a、4-a)はEpo濃度がEpoの活性と比較できないことを示した。

【0029】実験例4 封入された体積により評価したEpo濃度

封入された体積は当然のことながら与えられた技術によって生成されるリボソームの半径に依存し、各小胞の脂質組成および媒質のイオン組成によって影響を受ける。Epo/SSおよびEpo/SG-リボソームの封入体積は、各々7.08および4.74L/モル脂質であった。

* 【0030】封入効率は、二重層によって分離された水相区画率として定義された。Epo/SSまたはEpo/SG-リボソームの封入効率(各々74.3%または49.8%)は、封入体積に総脂質の量(105μモル)をかけてEpo溶液のものと体積(1ml)で割った値として計算された。

【0031】押出し調整およびゲル汙過後に残った脂質の量を、押出し調整前の最初の製剤中の量で割って、脂質回収率を得た。脂質回収率は、押出し調整およびゲル汙過後に残留するEpoの収率を示す。リボソーム中のEpoの収率は脂質回収率と封入効率とをかけて計算した。そしてリボソーム中のEpoの収率およびゲル汙過後の希釈倍率(9)は、ゲル汙過後のリボソーム懸濁液中の総Epoの活性が求められ、これを表3に要約した。

【0032】

【表3】

1 1
表3 封入した体積(各々7.08または4.74L/モル脂質)によって評価
した総Epoの活性およびEpo/SSおよびEpo/SG-リボソーム
の活性の保持率

| 製剤番号 | 脂質回収率 | Epoの収率 (%) | 総Epoの活性 (IU/ml) | 活性の保持率 ¹⁾ (%) |
|------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1-b | 100 ¹⁾ | 100 ²⁾ | 45000 ³⁾ | 16.2 |
| 1-a | 83.6 | 62.1 ²⁾ | 3105 ¹⁾ | 25.3 |
| 2-b | 100 ¹⁾ | 100 ²⁾ | 45000 ³⁾ | 34.4 |
| 2-a | 90.0 | 44.8 ²⁾ | 2240 ¹⁾ | 53.3 |
| 3-b | 100 ¹⁾ | 100 ²⁾ | 45000 ³⁾ | 76.1 |
| 3-a | 58.8 | 43.7 ²⁾ | 2185 ¹⁾ | 33.6 |
| 4-b | 100 ¹⁾ | 100 ²⁾ | 45000 ³⁾ | 57.0 |
| 4-a | 37.0 | 18.4 ²⁾ | 920 ¹⁾ | 58.3 |

¹⁾ 脂質回収率(%)はゲル濾過前を100%と評価した。

²⁾ Epoの収率は封入体積×105μモル×脂質回収率(%)に従って計算された。

³⁾ ゲル濾過前のEpoの収率は100%と仮定され、総Epoの活性はEpo溶液180,000(IU/ml)/4=45,000IU/mlに従って計算された。

⁴⁾ ゲル濾過後の総Epoの活性は45,000IU/ml×Epoの収率/9(希釈倍率)に従って計算された。

⁵⁾ 活性の保持率(%)= $\frac{\text{Epoの活性}}{\text{総Epoの活性}} \times 100$

活性の保持率は、総Epoの活性(表3)およびEpo

の活性(表2)から評価され、次の式によって表わされ*30 【0033】

活性の保持率(%)=Epoの活性/総Epoの活性×100 (2)

製剤1-bを製剤1-aと比較してEpoの活性の保持率から、未封入または封入の、Epoのどちらの部分の不活性化されるかを調べた。製剤1-bは未封入および封入のEpoの総活性として7293IU/mlを示した。45000IU/ml Epoの封入効率74.3%(=リボソーム中のEpo33435IU/ml)およびEpoの活性の保持率25.3%をもつ製剤1-aは、封入しているEpoの活性として8459IU/mlを示した。このため、4分の超音波処理によって製造したEpo/SS-リボソーム懸濁液中の製剤1-bには、未封入のEpoには活性は存在しないであろう。

【0034】製剤2-bは15494IU/mlを示し、製剤2-aは11945IU/mlを示した。4分の超音波処理によって製造したSG-リボソーム懸濁液中の未封入のEpoの活性は、7.9%であった。

【0035】これらの結果は、4分の超音波処理を用いるリボソーム製法によって、Epo/SSおよびEpo/SG-リボソーム中に封入されていないEpoの活性の約100%および92%、そしてEpo/SSおよび

*Epo/SG-リボソーム中に封入されているEpoの活性の約75%および47%が各々損傷を受けたことを示している。このことは、リボソームの二重層がEpoの活性を保護する効果を有することを示した。

【0036】表3の結果は、押し調整後、ゲル濾過したEpo/SSおよびEpo/SGリボソームは、それぞれ25.3%(超音波処理時間4分)、33.6%(超音波処理時間1分)および、53.3%(超音波処理時間4分)、58.3%(超音波処理時間1分)の活性を保持していることを示している。

【0037】実験例5 動物実験による経口投与後の循環性網状赤血球数
生後9~10週令(体重250~350g)の雄ウィスター(Wistar)ラット(埼玉実験動物供給所)を使用した。ラット(1グループ3匹)を、ラット固定盤に仰向けに固定し、ゾンデを用いて実施例2で調製したEpoを封入しているリボソームを所定量経口投与した。投与前(0日目)及び投与後2日および4日目のほぼ一定時刻に、ラットの背中足静脈を注射針(25G)

13

で穿刺して出血させ、マイクロピペットにて $20\mu\text{l}$ を採血してサンプルとした。Epoの薬理効果の指標として、Epoの投与後の網状赤血球数の変化を実験例1と同様の方法で測定した。

【0038】結果を図4(Epo/Ch($0.1\mu\text{m}$)-リボソーム)、図5(Epo/SS($0.1\mu\text{m}$)-リボソーム)および図6(Epo/SG($0.2\mu\text{m}$)-リボソーム)に示す。

【0039】図4に見られるように、低用量($36,000\text{IU/kg}$)の投与群(3匹)では2日目に増加が見られ、中用量($108,000\text{IU/kg}$)の投与群では3日目および9日目に増加が見られた。

【0040】図5では、低用量($36,000\text{IU/kg}$)投与群では投与後2日目に増加が見られ、中用量 *

14

*($108,000\text{IU/kg}$)の投与群では4日目、7日目に増加のピークがあるものが見られ、高用量($180,000\text{IU/kg}$)の投与群では4日目に増加のピークがあるものが見られた。

【0041】図6では、 $18,000\text{IU/kg}$ 投与群で投与後2日目にわずかながら増加のピークが見られた。

【0042】実験例6 HPLCによるリボソーム中のEpo活性保持率

実施例2で調製した製剤番号5ないし10のEpo封入リボソームについて、HPLCによりEpo活性を測定し、活性保持率を算出した。測定方法は、前記実験例2記載の方法に従った。結果を次に示す。

【0043】

| 製剤番号 | リボソームの型 | ゲル濾過 | 整粒孔径 (μm) | Epo活性保持率 (IU/ml) |
|------|---------|------|---------------------------|--------------------------------|
| 5 | SS | 有り | 0.1 | 14.9 |
| 6 | SG | 有り | 0.1 | 39.1 |
| 7 | Ch | 有り | 0.1 | 19.2 |
| 8 | SS | 有り | 0.2 | 16.2 |
| 9 | SG | 有り | 0.2 | 34.4 |
| 10 | Ch | 有り | 0.2 | — |

【図面の簡単な説明】

【図1】循環性網状赤血球数への、遊離Epo溶液の1回の皮下投与の効果を示す。投与量は各々100(四角)、300(丸)および1000(黒四角) IU/kg ラットである。値は平均 \pm S.D.($n=3$)である。

【図2】循環性網状赤血球数への、ゲル濾過後のEpo/SSおよびEpo/SG-リボソーム懸濁液の1回の皮下投与の効果を示す。点線および中空の印はEpo/SS-リボソーム(製剤1-a)を表わす。実線および中実の(solid)印はEpo/SG-リボソーム(製剤2-a)を表わす。投与体積は各々0.3(丸)、0.1(四角)および0.03(三角) ml/300g である。値は平均 \pm S.D.($n=3$)である。

【図3】1回の皮下投与の2日後の循環性網状赤血球数に関しての、ゲル濾過前のEpo/SS-リボソーム(製剤1-b、灰色)のゲル濾過後のEpo/SS-リボソーム(製剤1-a、黒)との比較を示す。ゲル濾過前のリボソームの投与体積は、リボソーム懸濁液の濃度がゲル濾過後に1/9まで希釈されるので、ゲル濾過後※

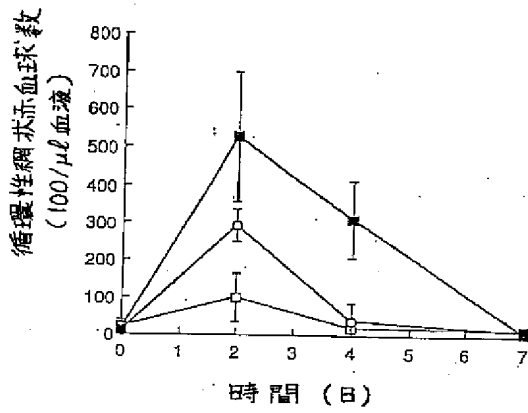
※の投与体積の1/9である。値は平均 \pm S.D.($n=3$)である。

【図4】実施例2でDPPCとChとを用いて調製したリボソーム(製剤7)の経口投与による、循環網状赤血球数の変化を示す。図中の2つのグラフはそれぞれ投与量が $36,000\text{IU/kg}$ 、 $108,000\text{IU/kg}$ の群についての結果であり、各グラフとも3匹のラットについて得られた測定値を示す。

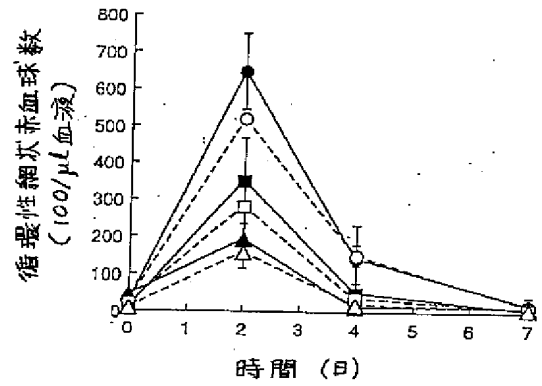
【図5】実施例2でDPPCとSSとを用いて調製したリボソーム(製剤5)の経口投与による、循環網状赤血球数の変化を示す。図中の3つのグラフはそれぞれ投与量が $36,000\text{IU/kg}$ 、 $108,000\text{IU/kg}$ 、 $180,000\text{IU/kg}$ の群についての結果であり、各グラフとも3匹のラットについて得られた測定値を示す。

【図6】実施例2でDPPCとSGとを用いて調製したリボソーム(製剤9)の経口投与による、循環網状赤血球数の変化を示す。投与量が $18,000\text{IU/kg}$ の群についての結果であり、4匹のラットについて得られた測定値を示す。

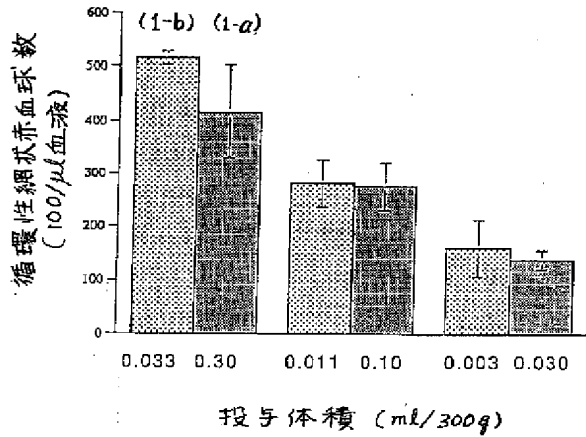
【図1】



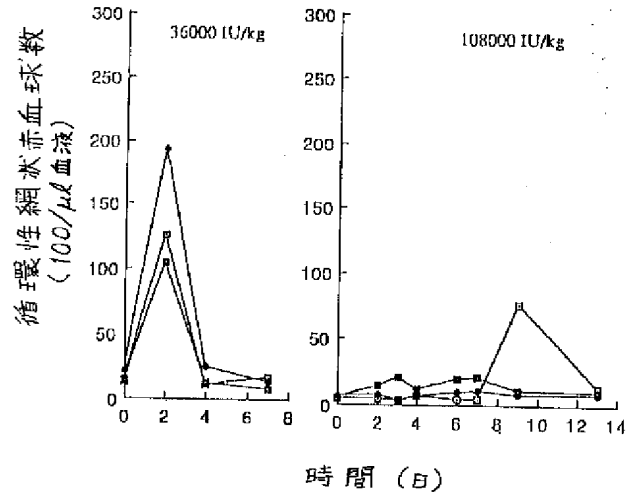
【図2】



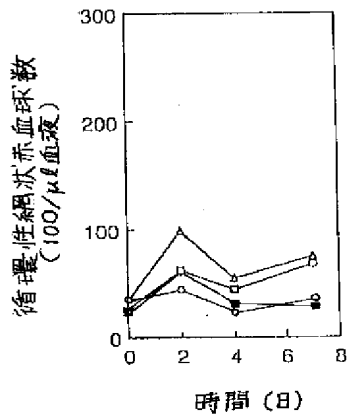
【図3】



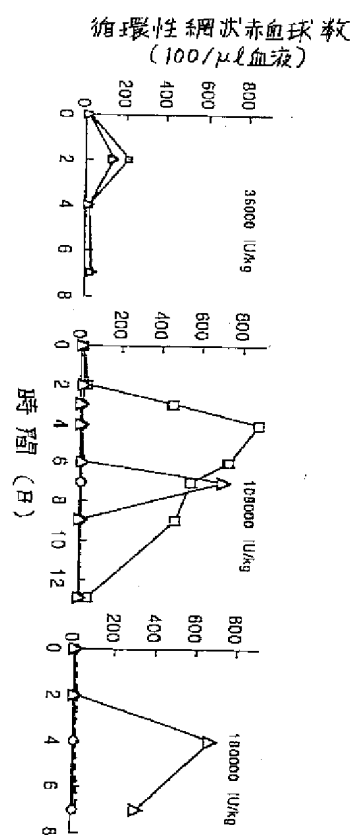
【図4】



【図6】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

C 0 7 K 14/505

識別記号

片内整理番号

8517-4H

F I

C 0 7 K 14/505

技術表示箇所

PAT-NO: JP408231417A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08231417 A
TITLE: LIPOSOME PREPARATION OF ERYTHROPOIETIN
PUBN-DATE: September 10, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

| NAME | COUNTRY |
|------------------|---------|
| NAGAI, TSUNEJI | |
| YONETANI, YOSHIE | |

ASSIGNEE-INFORMATION:

| NAME | COUNTRY |
|--------------------------|---------|
| CHUGAI PHARMACEUT CO LTD | N/A |

APPL-NO: JP07226610
APPL-DATE: September 4, 1995

INT-CL (IPC): A61K038/22 , A61K009/127 , A61K047/24 ,
A61K047/28 , C07K014/505

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain liposome which can include erythropoietin having actions to regulate the proliferation and differentiation of erythrocyte precursor cells in high inclusion efficiency and protects these actions.

CONSTITUTION: This liposome preparation includes

erythropoietin(Epo). As a lipid for forming the vesicular wall of the liposome, dipalmitoyl phosphatidylcholine is preferably used. In addition, in order to sustain the activity of Epo, sterol (SA) and/or sterol glycoside (SAG) is formulated to the lipid. Preferred SA is β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol and/or cholesterol, while the SAG is preferably a monoglycoside of either one of these sterols. The liposome is obtained by using a mixture of the lipid and SA and/or SAG to include Epo by the reverse-phase evaporation.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO